

Espectrometría de Masas aplicada a la Proteómica

Giuseppe Lattanzio

La Proteómica y el Proteoma

- La “proteómica” es el estudio a gran escala del proteínas expresadas en un organismo en un momento dado y bajo determinadas condiciones
- La palabra “proteoma” es la fusión de “proteína” y “genoma”



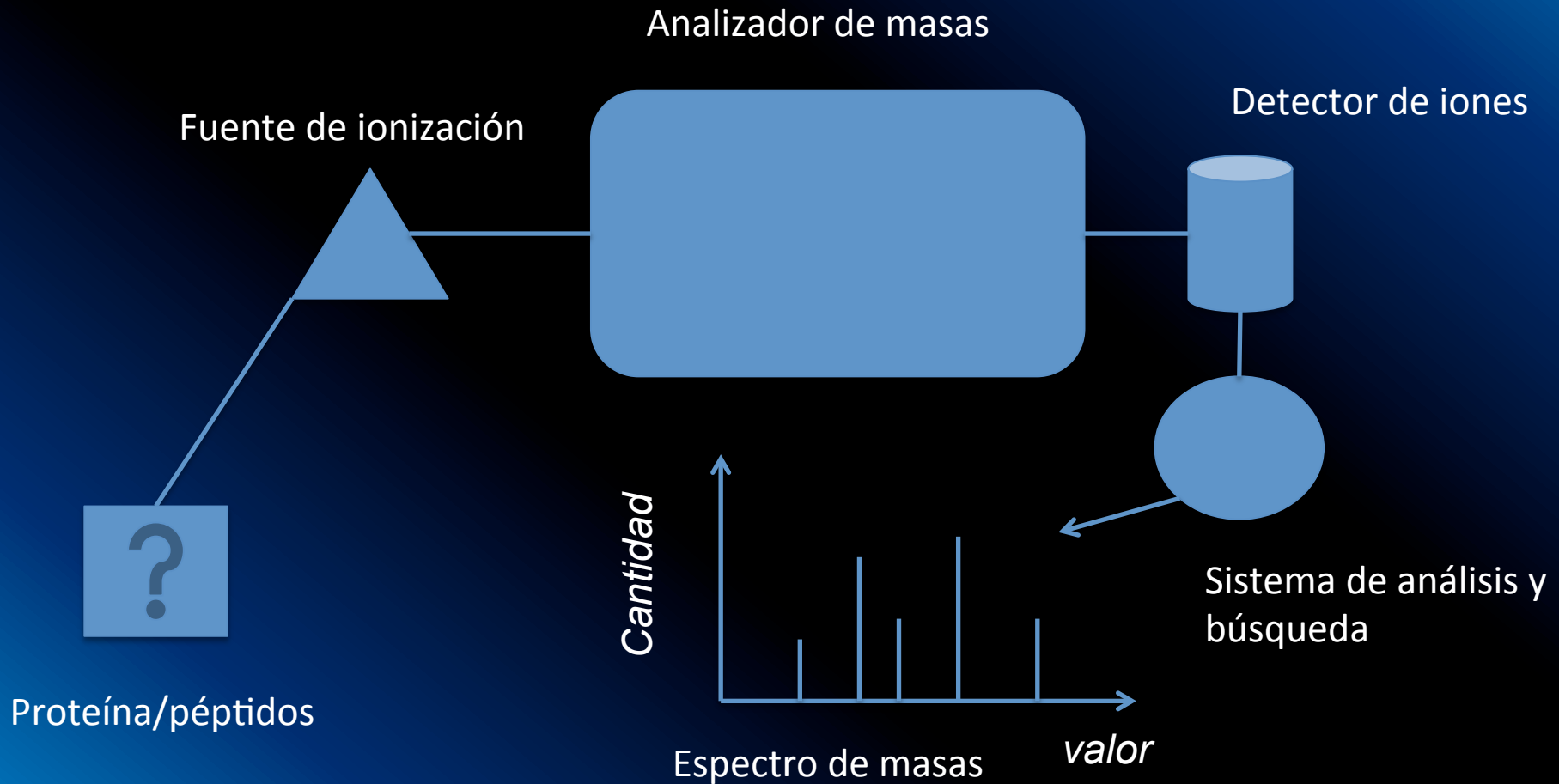
¿Qué es la Espectrometría de Masas (MS)?

...sirve para medir la masas de átomos o moléculas

...potente herramienta analítica usada para identificar y cuantificar compuestos y materiales desconocidos, y para elucidar así las estructuras y las propiedades químicas de la moléculas

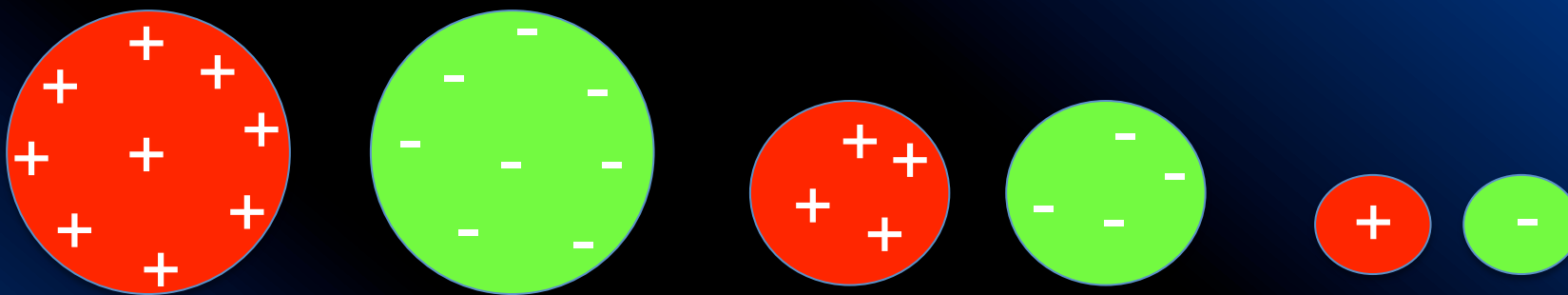


En teoría trabaja así...



Iones y carga

- Un MS mide iones: partículas de moléculas o átomo electrónicamente cargadas



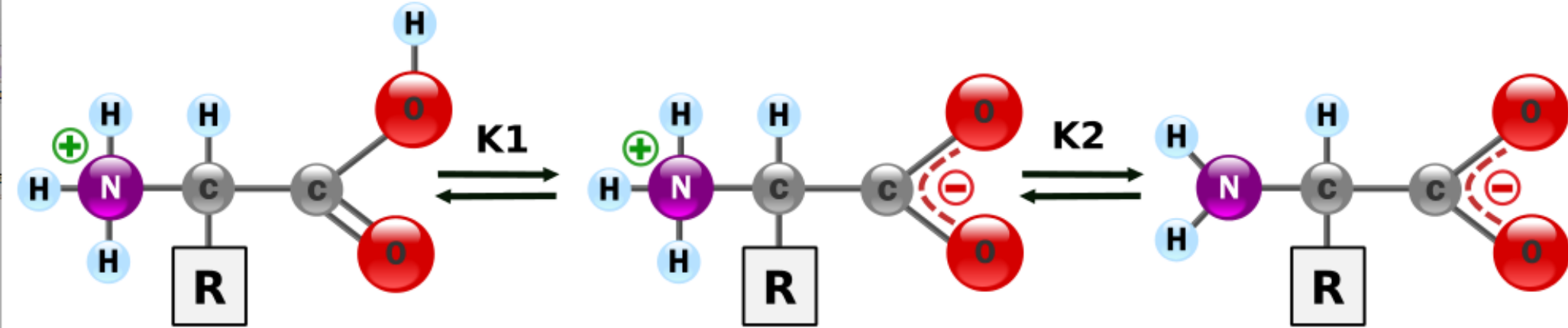
- Los iones se pueden considerar como una pila: pueden ser positivamente o negativamente cargados



- Un MS “pesa” electrónicamente las moléculas por atracción y repulsión iónica, en función de la masa y carga (m/z)



Aminoácidos



Forma dipolar

Carga positiva
 $MH^+ = (MW+1)/1$

Carga neta 0
 $M = MW$

Carga negativa
 $M^- = (MW-1)/1$



Clasifica y cuenta



Clasifica y cuenta

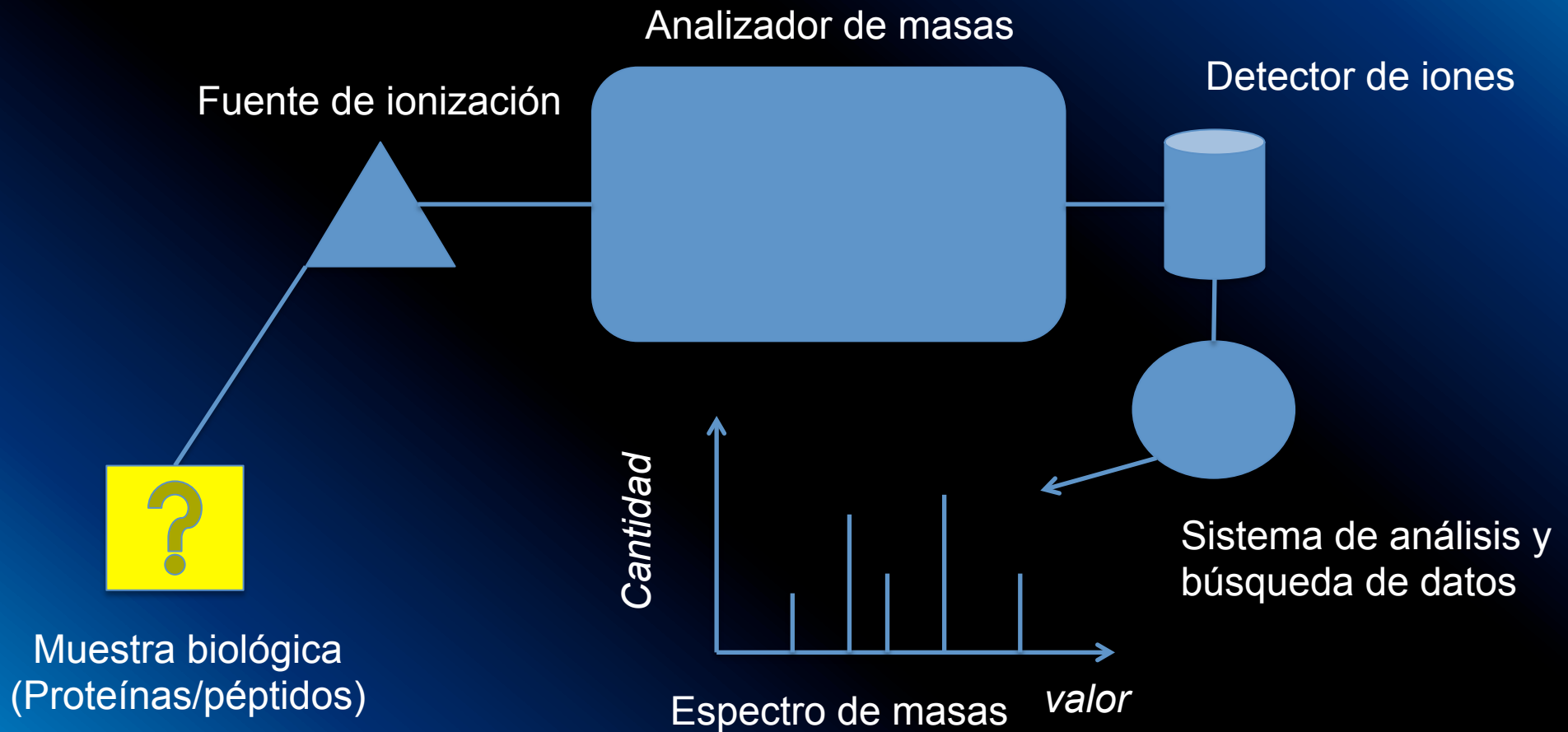


Aplicaciones en Proteómica

- Determinación de la masas molecular
 - Confirmación de proteínas
 - Modificaciones postrasdducionales, mutaciones
 - Interacciones de proteínas
- Identificaciones de proteínas
 - *Peptide Mass Fingerprint* (PMF)
 - Secuenciación peptídica (MS/MS)
- Determinación de la estructura
- *Imaging*



¿cómo trabaja un Espectrómetro de Masas (MS)?



Métodos de separación de proteínas y péptidos

→ Electroforesis en geles

- 1D SDS/PAGE
- 2D IEF-SDS/PAGE

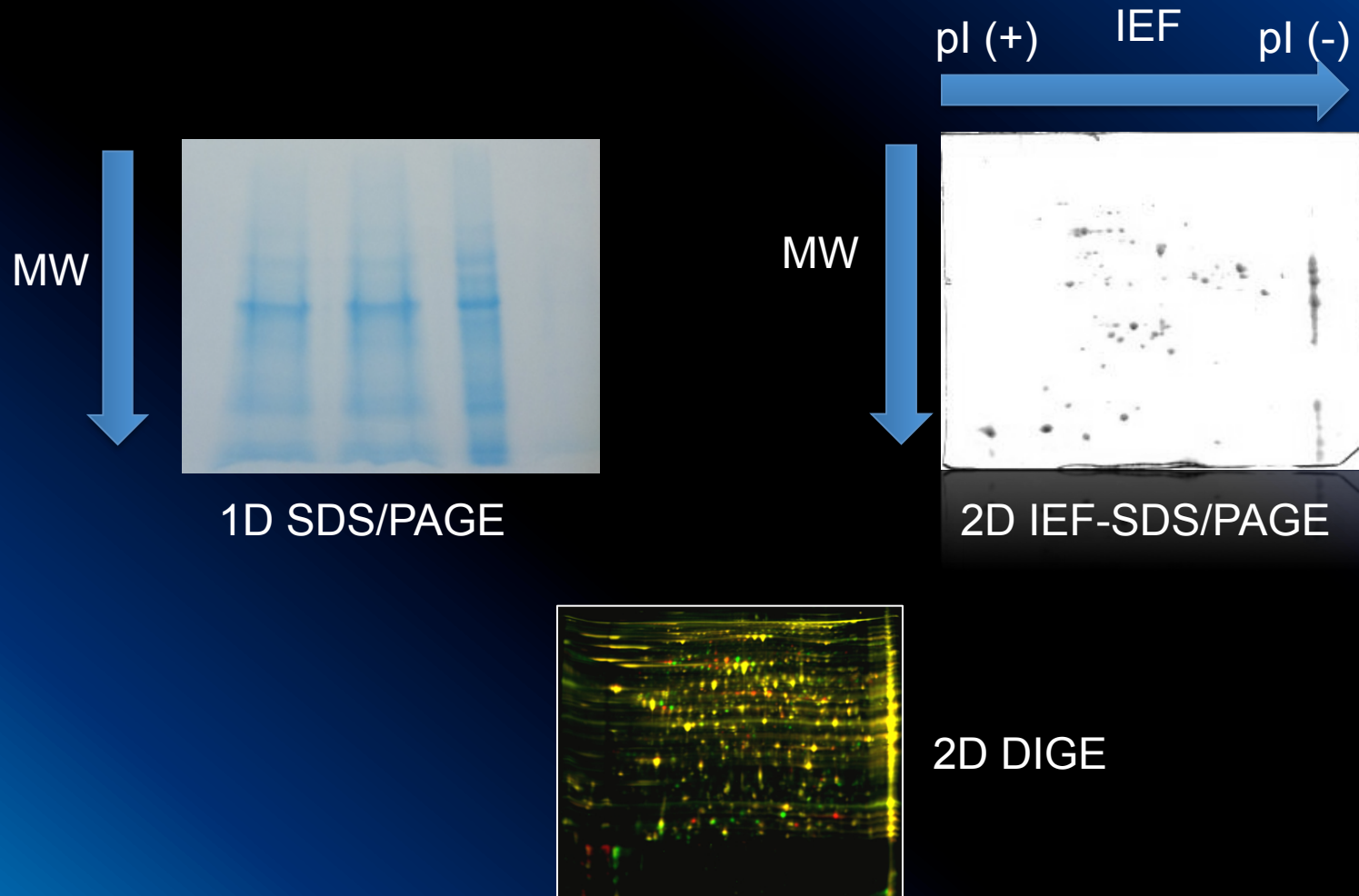
→ Cromatografía líquida (LC)

- LC en fase reversa (C18)
- LC multidimensional

- Electroforesis capilar
- Cromatografía de Afinidad
- IMAC
- ...



Geles SDS/PAGE



Cromatografía líquida

- **nHPLC:**
 - Fase reversa (C18)
- **LC bidimensional:**
 - 1º con intercambio iónico
 - 2º con fase reversa (C18)
- **UPLC o UHPLC:**
 - Fase reversa (C18)



nHPLC Agilent 1200



Métodos de ionización

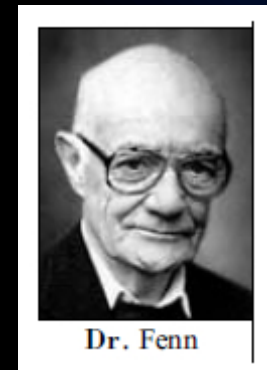


→ Desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI)

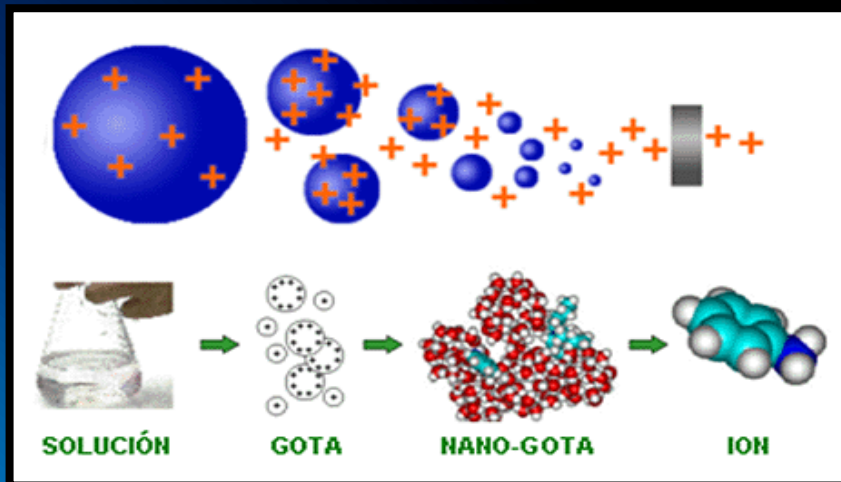
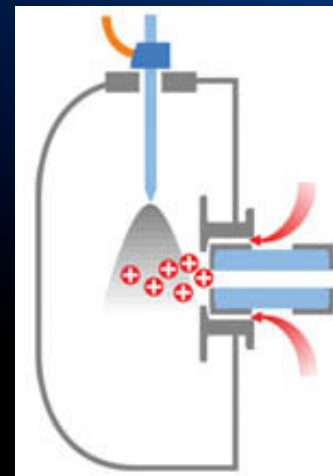
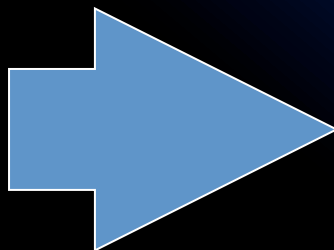
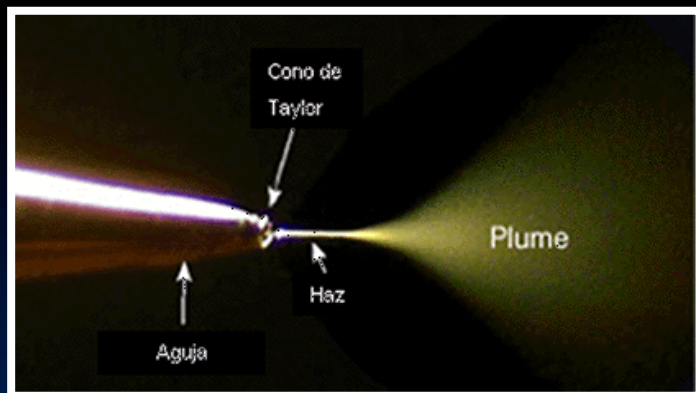
- impacto de fotones de alta energía con la muestra incrustada en una matriz sólida orgánica

→ Ionización por *electrospray* (ESI)

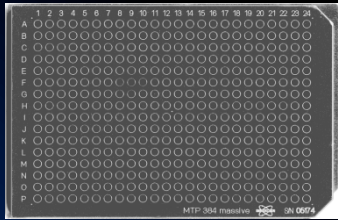
- formación de gotas cargadas desde la cual se forman iones por desolvatación o desorción



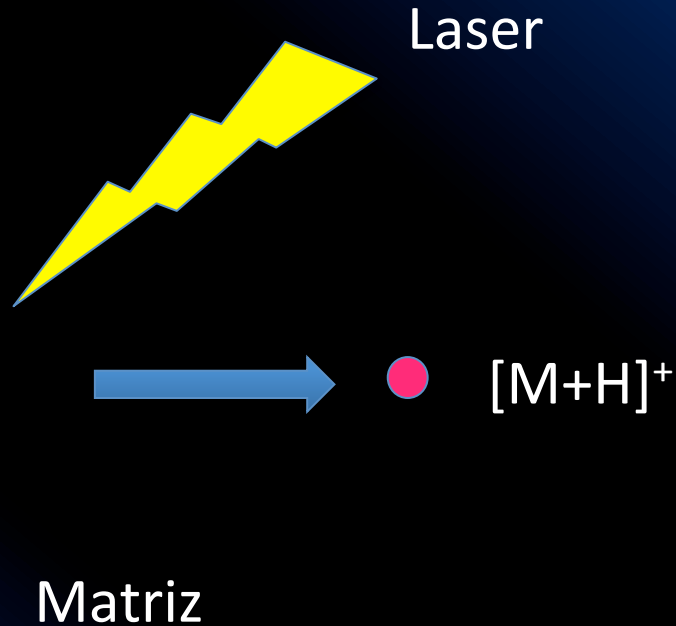
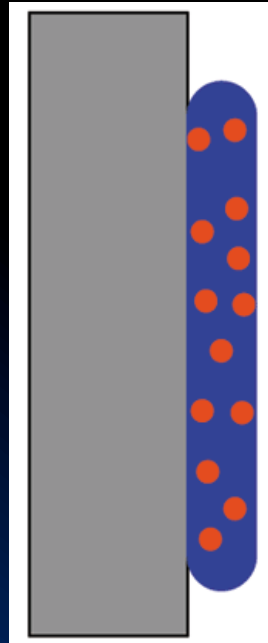
Ionización por *electrospray* (ESI)



Desorción/ionización laser asistidas por matriz (MALDI)



Target



MALDI TOF



MALDI TOF/TOF

→ 2 steps: co-cristalización asistida y desorción laser



MALDI vs ESI

- MALDI

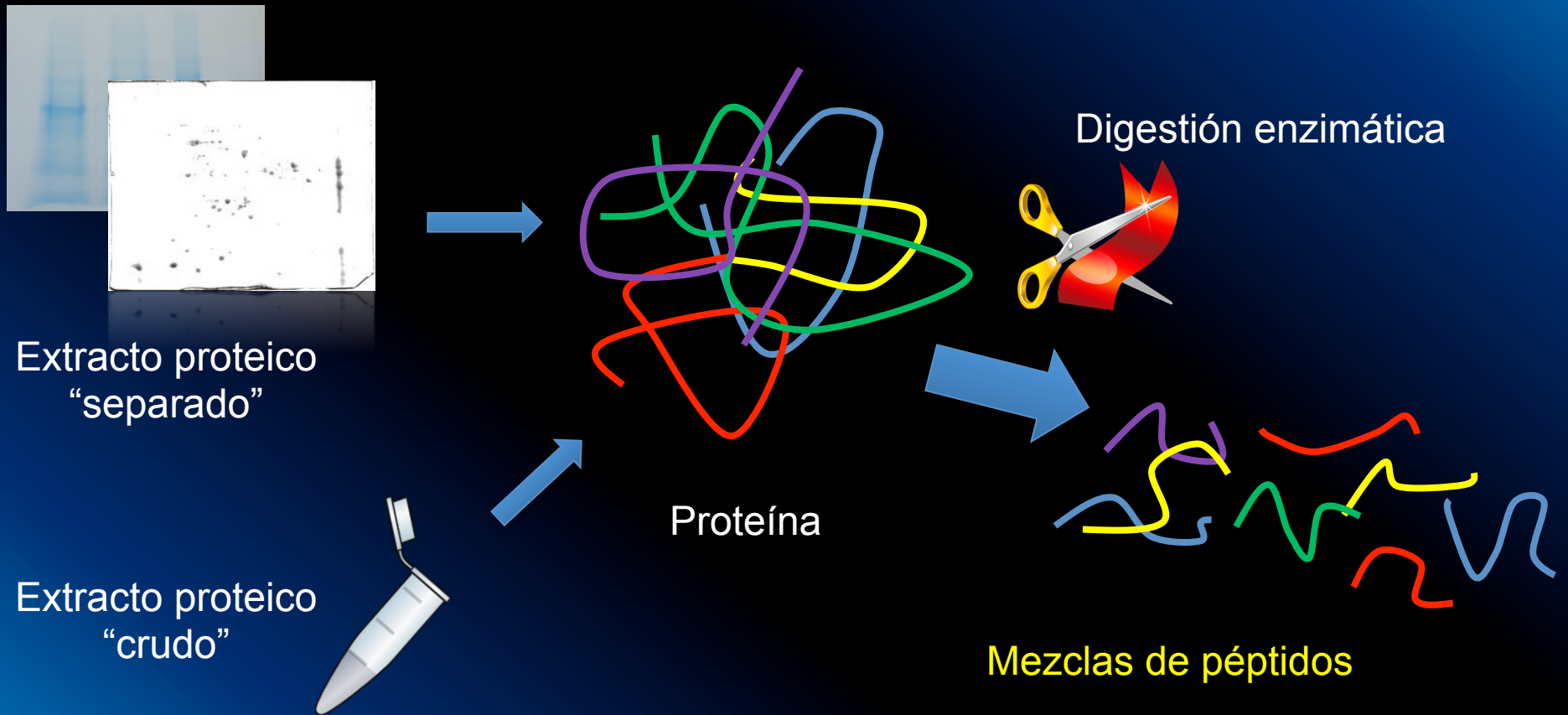
- Solido
- Iones monocargados
- Ionización suave
- Componentes principales
- Tolerante a las contaminación
- Mas rápido y fácil de manejar
- Menor gasto de muestra
- Moléculas pequeñas
- Permite re-analizar las muestras

- ESI

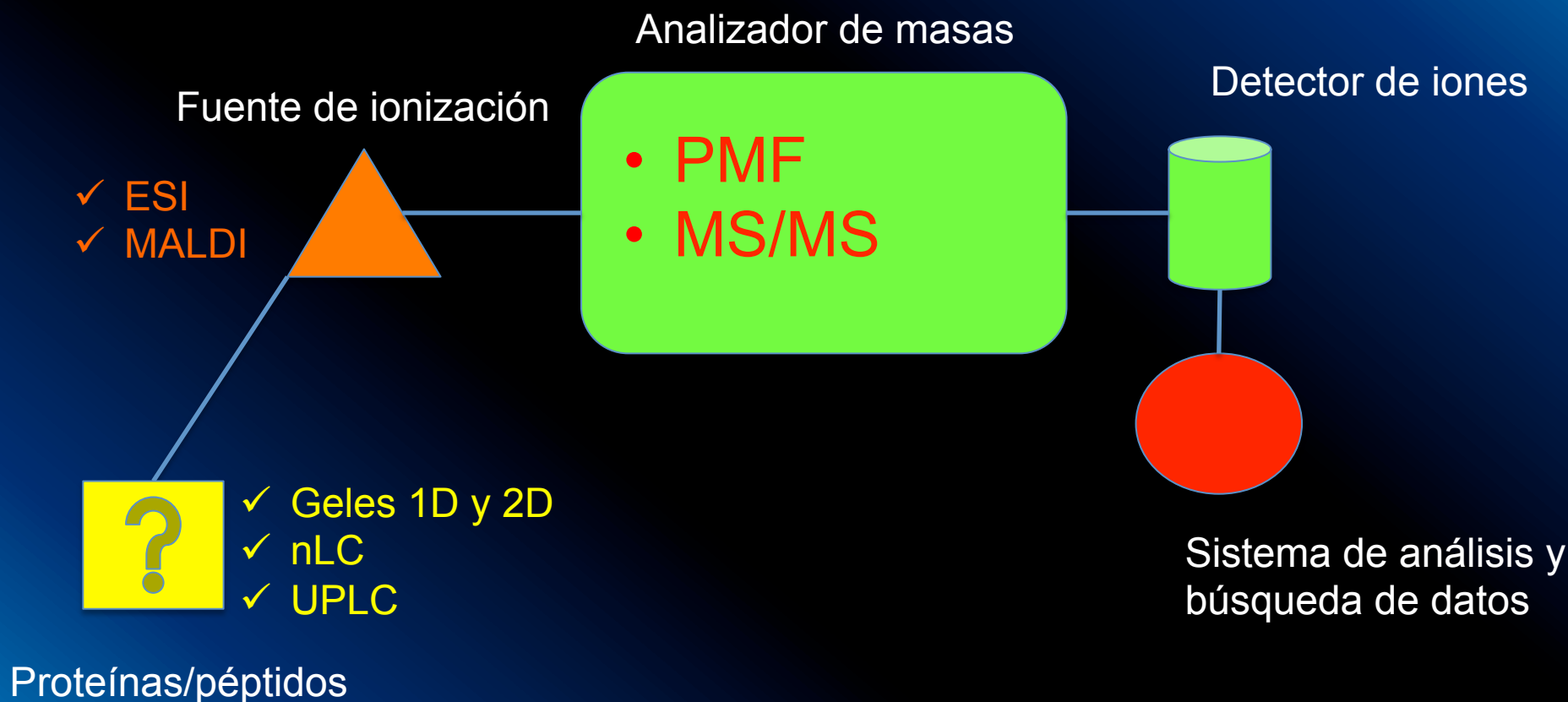
- Liquido
- Iones multicargados
- Ionización mas suave
- Componentes principales y minoritarios
- Mas sensible
- Mas complejo
- Moléculas grandes
- *on-line* LC



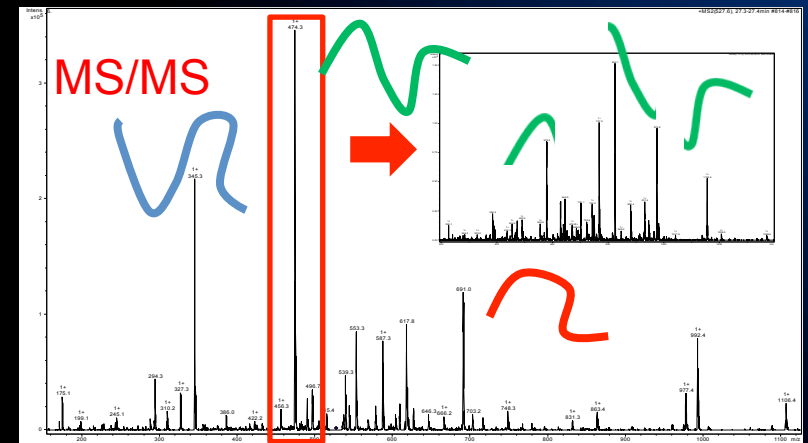
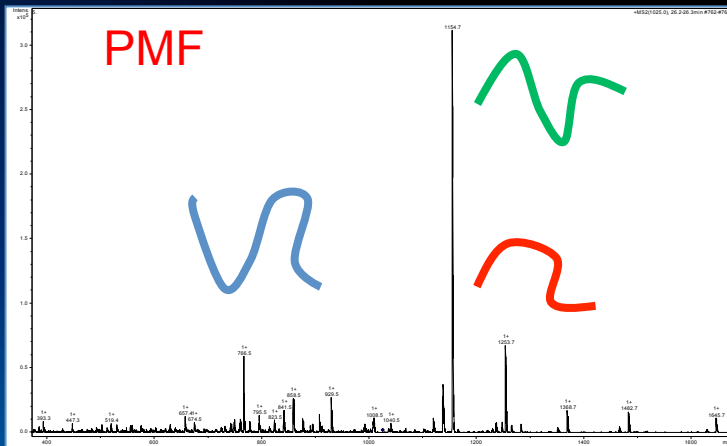
Digestión *in-gel* y *in-solution*



¿cómo trabaja un Espectrómetro de Masas (MS)?



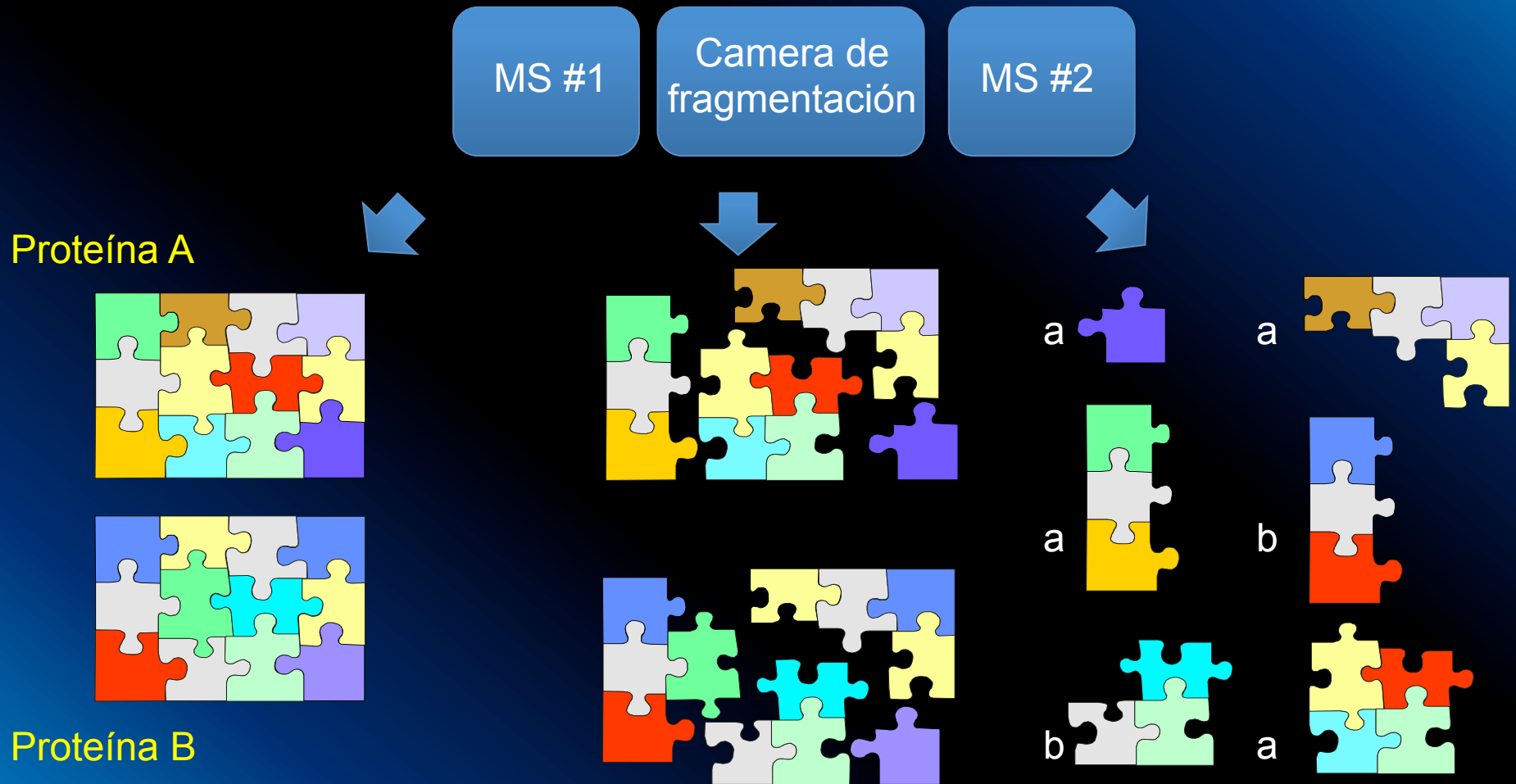
PMF vs MS/MS



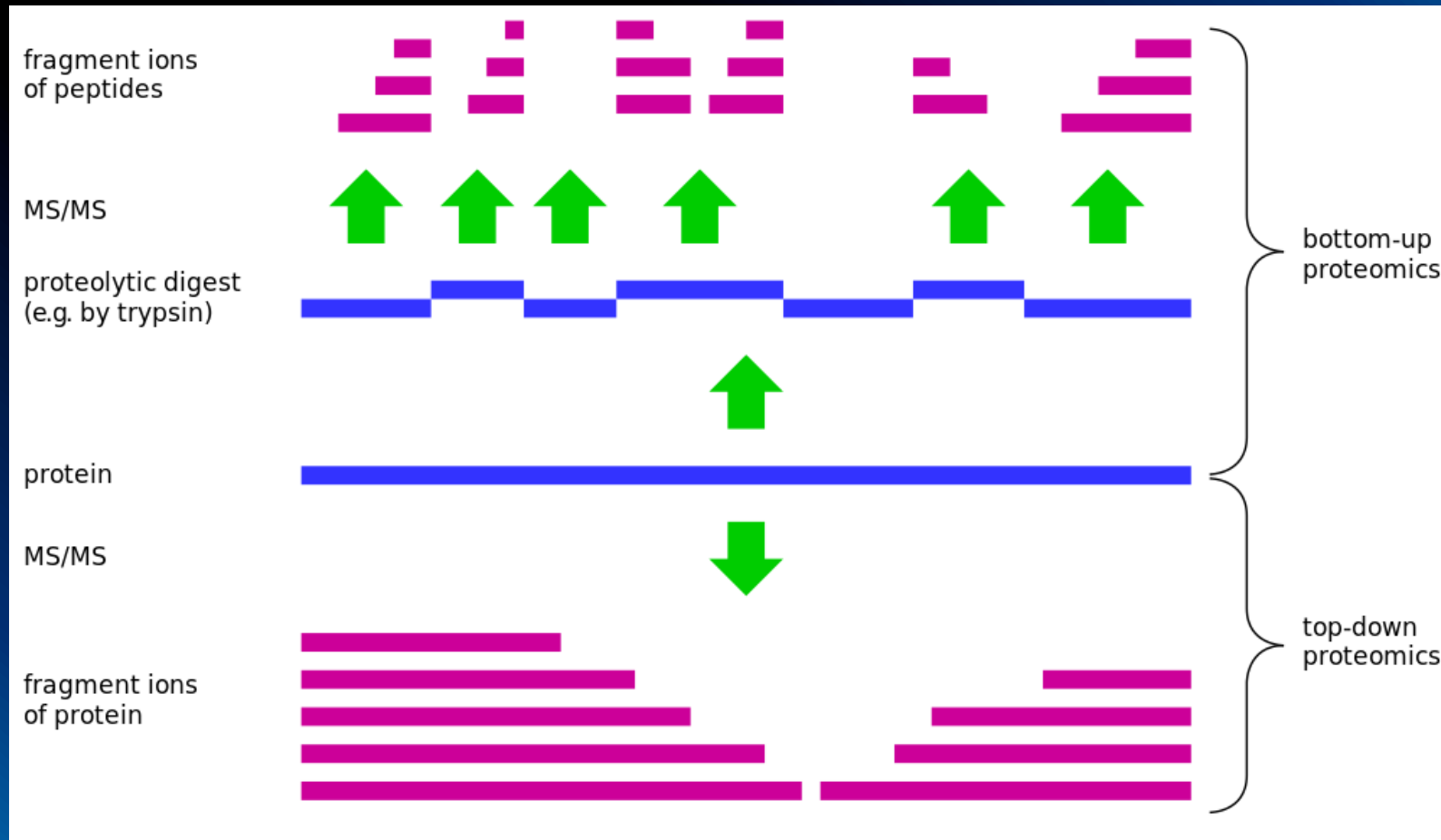
MW teórica vs MW calculada



¿Que es el *Tandem* MS/MS?



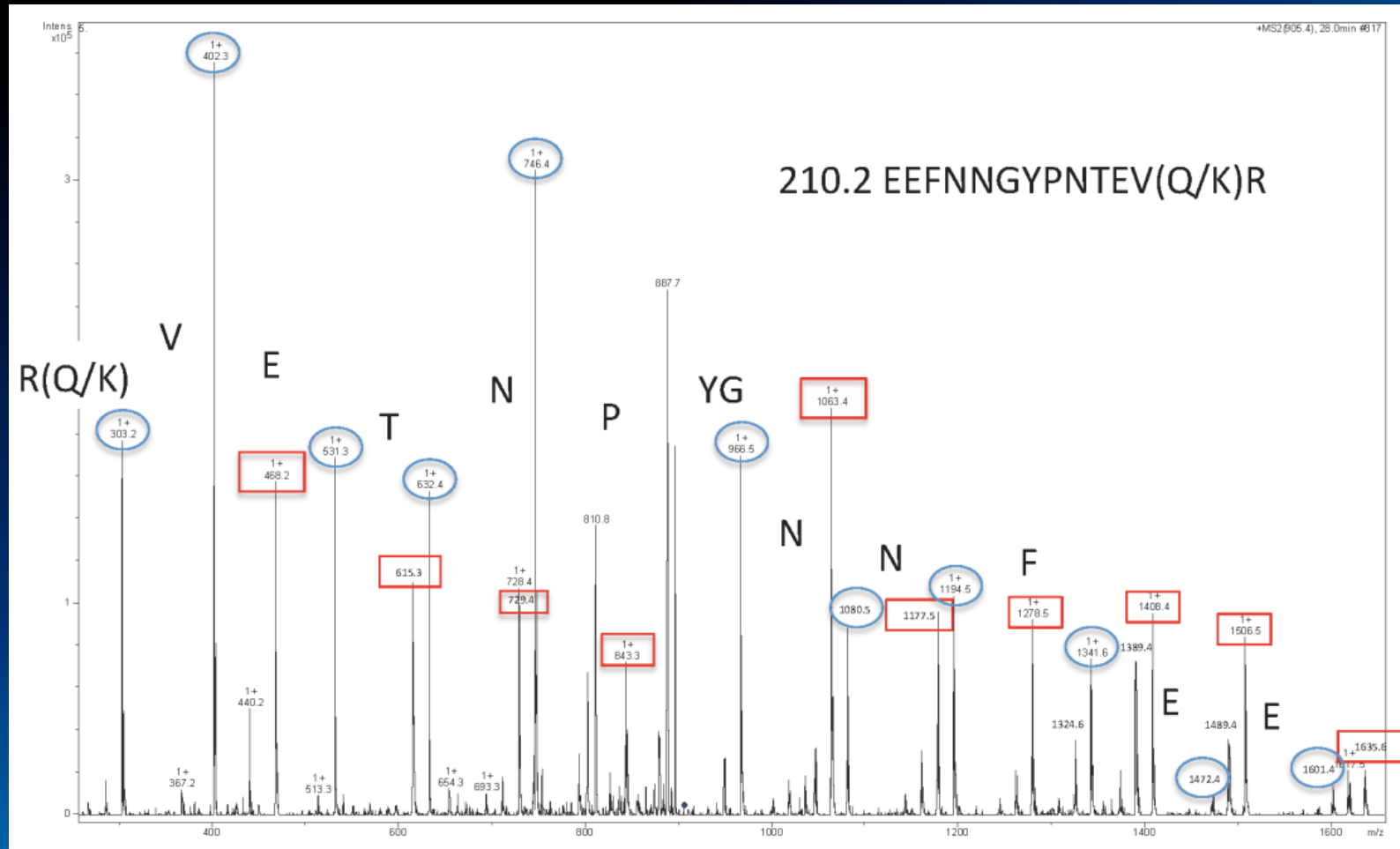
Bottom-up y Top-down proteomics



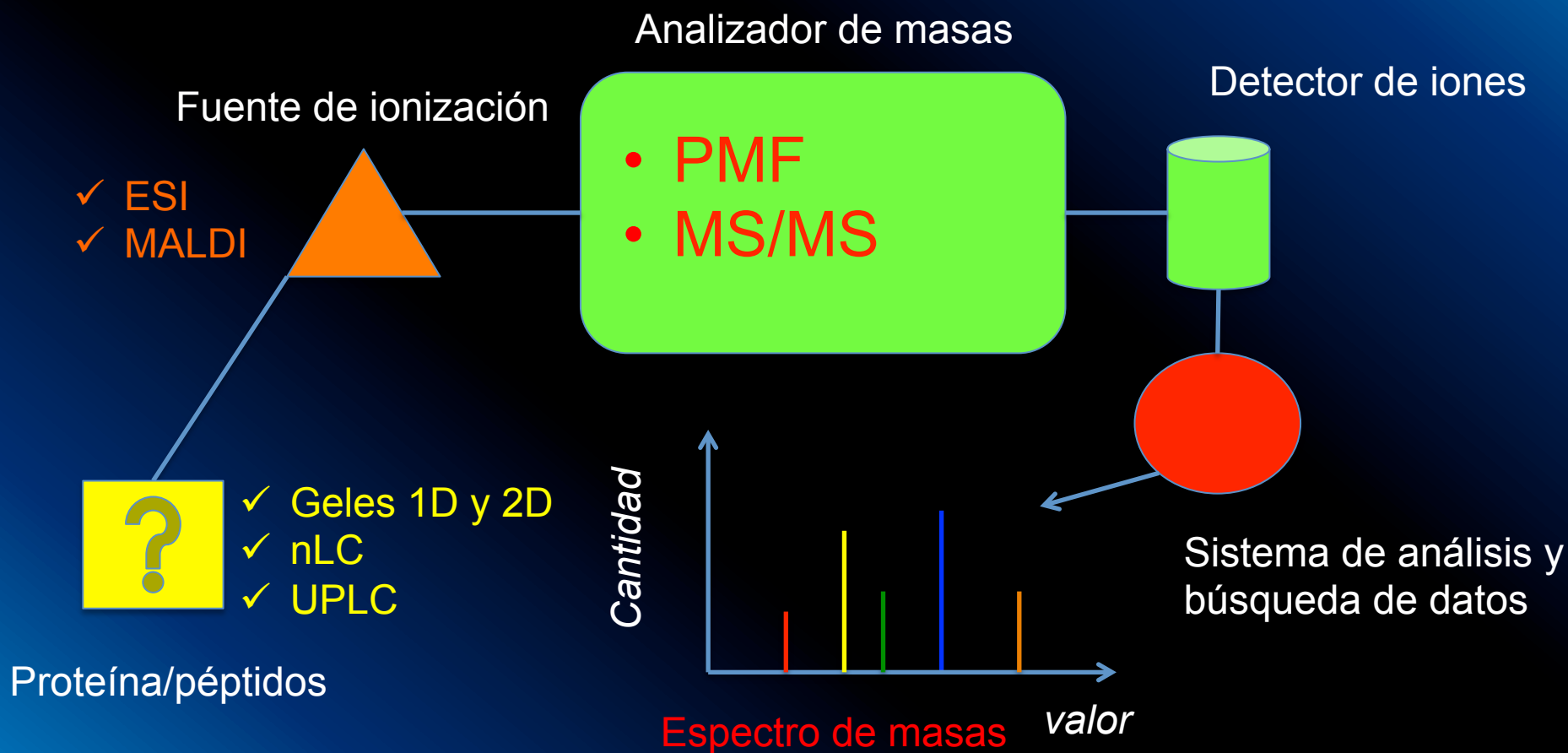
http://en.wikipedia.org/wiki/Bottom-up_proteomics



Bottom-up y Top-down proteomics

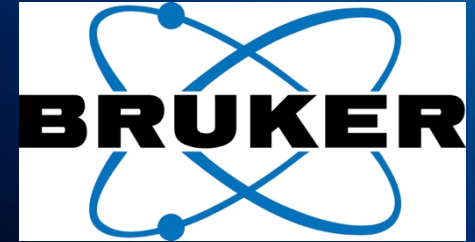


¿cómo trabaja un Espectrómetro de Masas (MS)?



Tipos de MS

- MALDI TOF (*time of flight*)
- MALDI TOF/TOF
- Cuadrupolo (Q)
- Triple cuadrupolo (QqQ)
- Trampa iónica (IT)
- qTOF
- *Tiple* TOF (AB SCIEX)
- MaXis (Bruker)
- qTRAP (AB SCIEX)
- LTQ y Orbitrap (Thermo)



Proteómica “clásica” y de “segunda generación

- *Bottom-up proteomics*

- Spot 1D y 2D + tripsina + MALDI TOF y TOF/TOF

- Spot 1D y 2D + tripsina + nLC + ESI-MS/MS

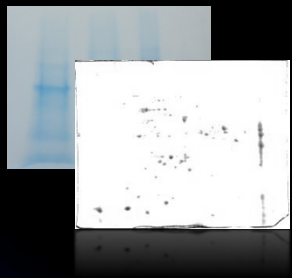
- *Shotgun proteomics*

- Geles 1D (**16 slices**) + nLC o UPLC + ESI-MS/MS

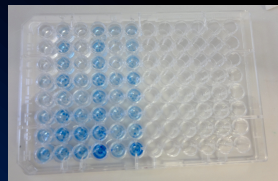
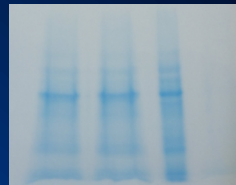
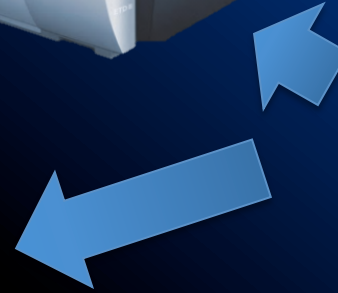
- **Extracto crudo** nLC o UPLC + ESI-MS/MS

- ✓ Softwares de análisis de datos

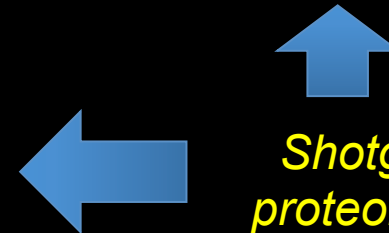




*Bottom-up
proteomics*



*Shotgun
proteomics*



Plant Stress Physiology

ESTACIÓN
EXPERIMENTAL
DE AULA DEI

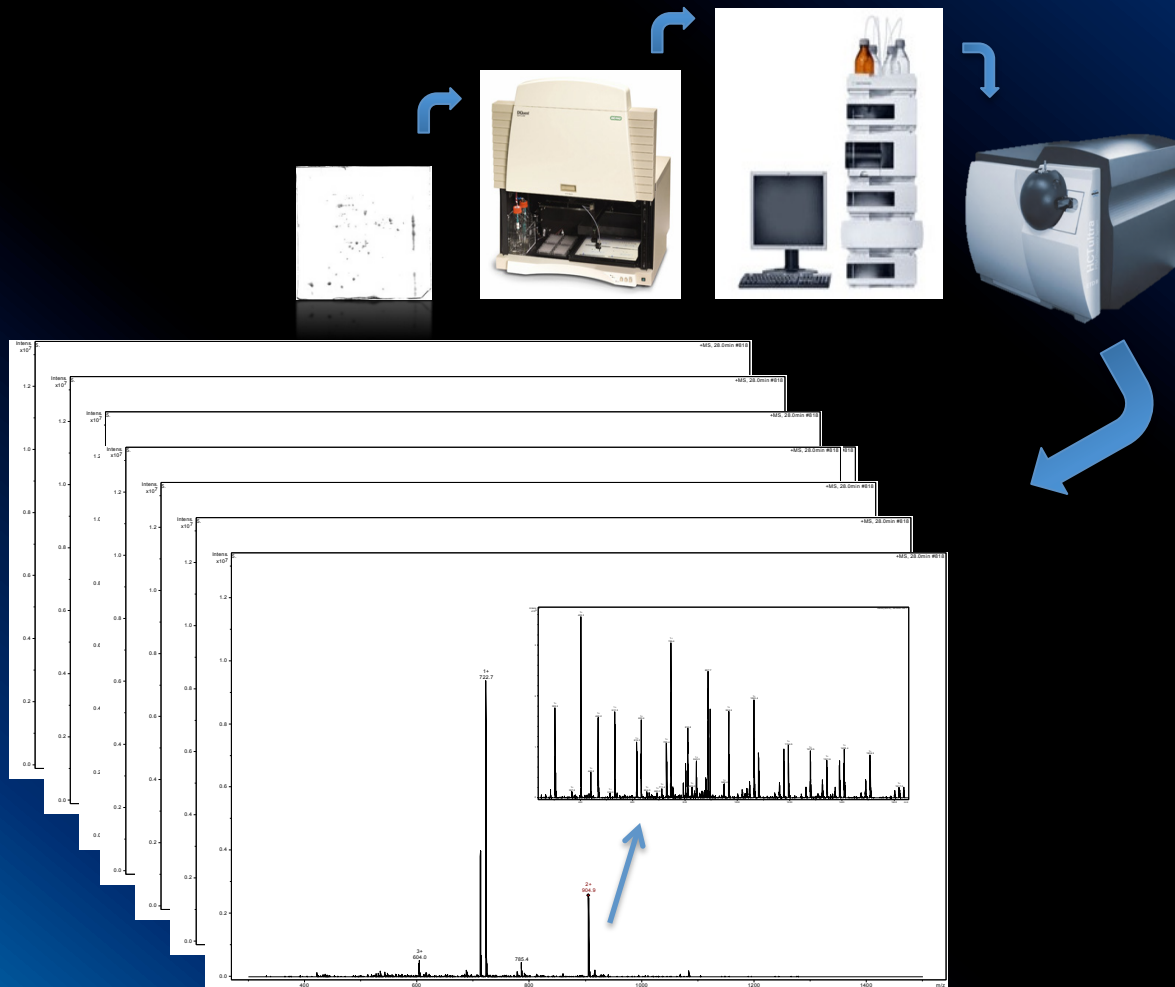


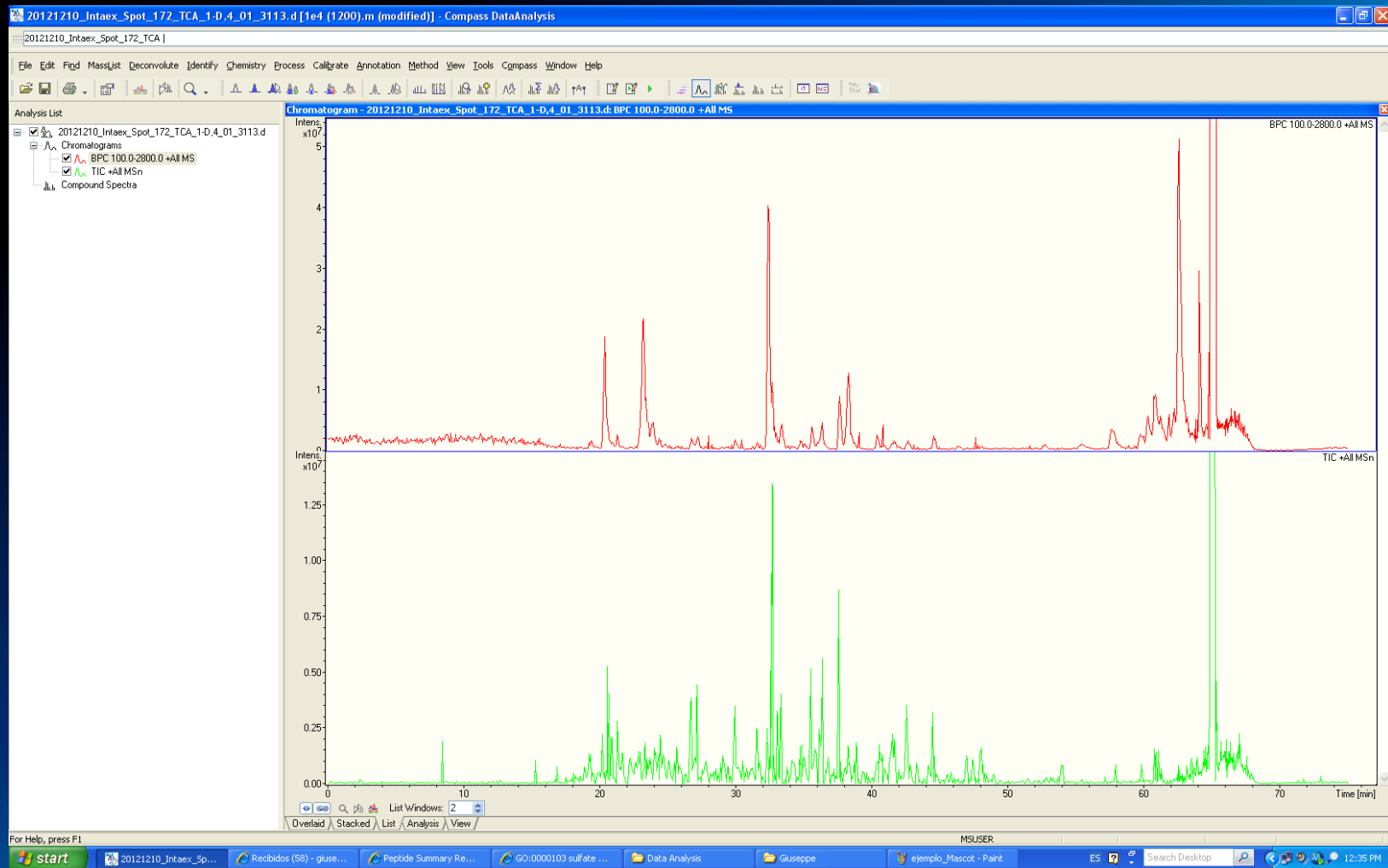
Identificación de proteínas

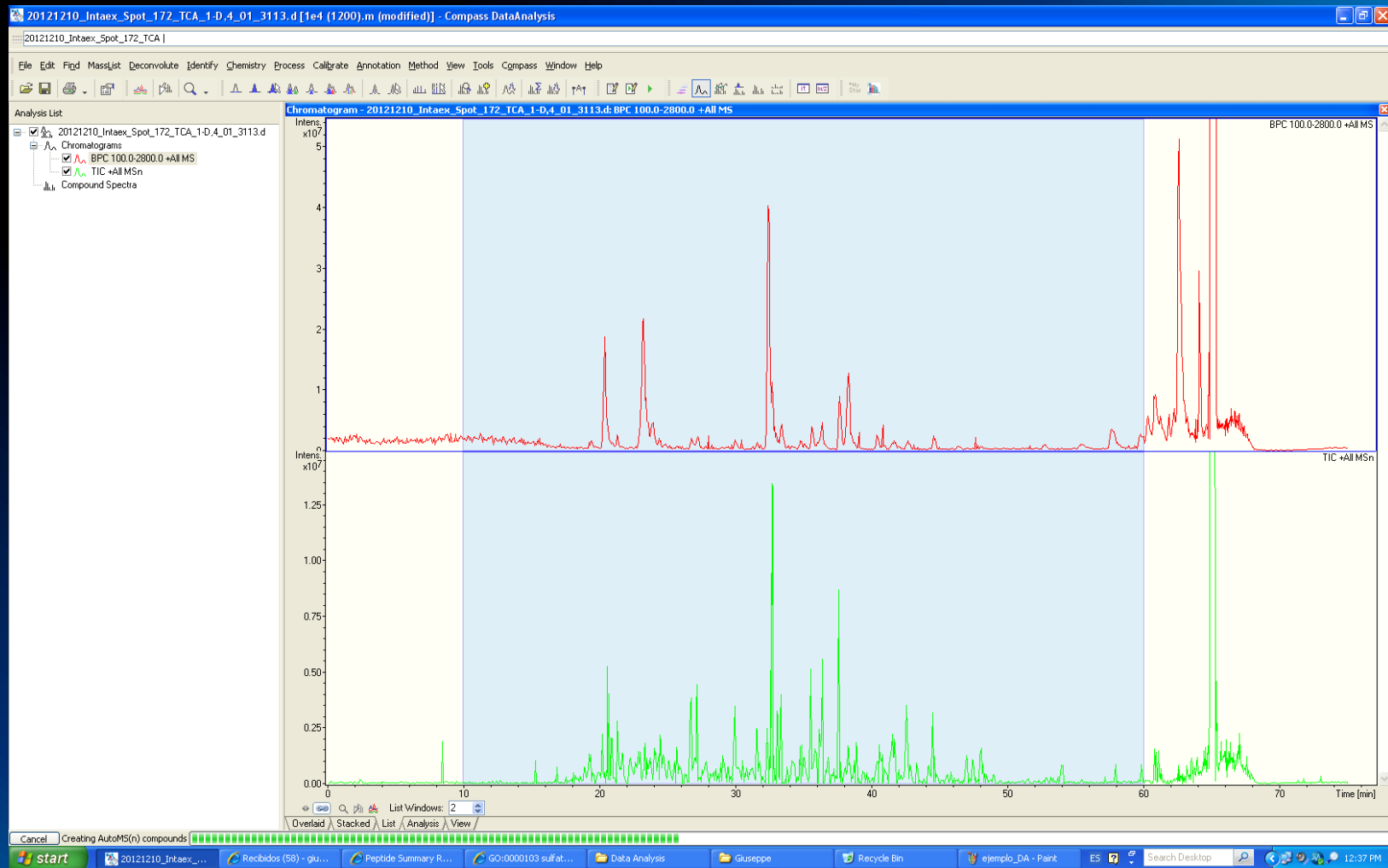
- **Análisis de los datos “crudos”**
 - según el fabricante (.XLM; .mzML; .DTA o .mgf)
- **Bases de datos**
 - NCBI Inr; SwissProt; EMBL EST
- **Motores de búsquedas**
 - MASCOT; X!Tandem (GPM) o SEQUEST

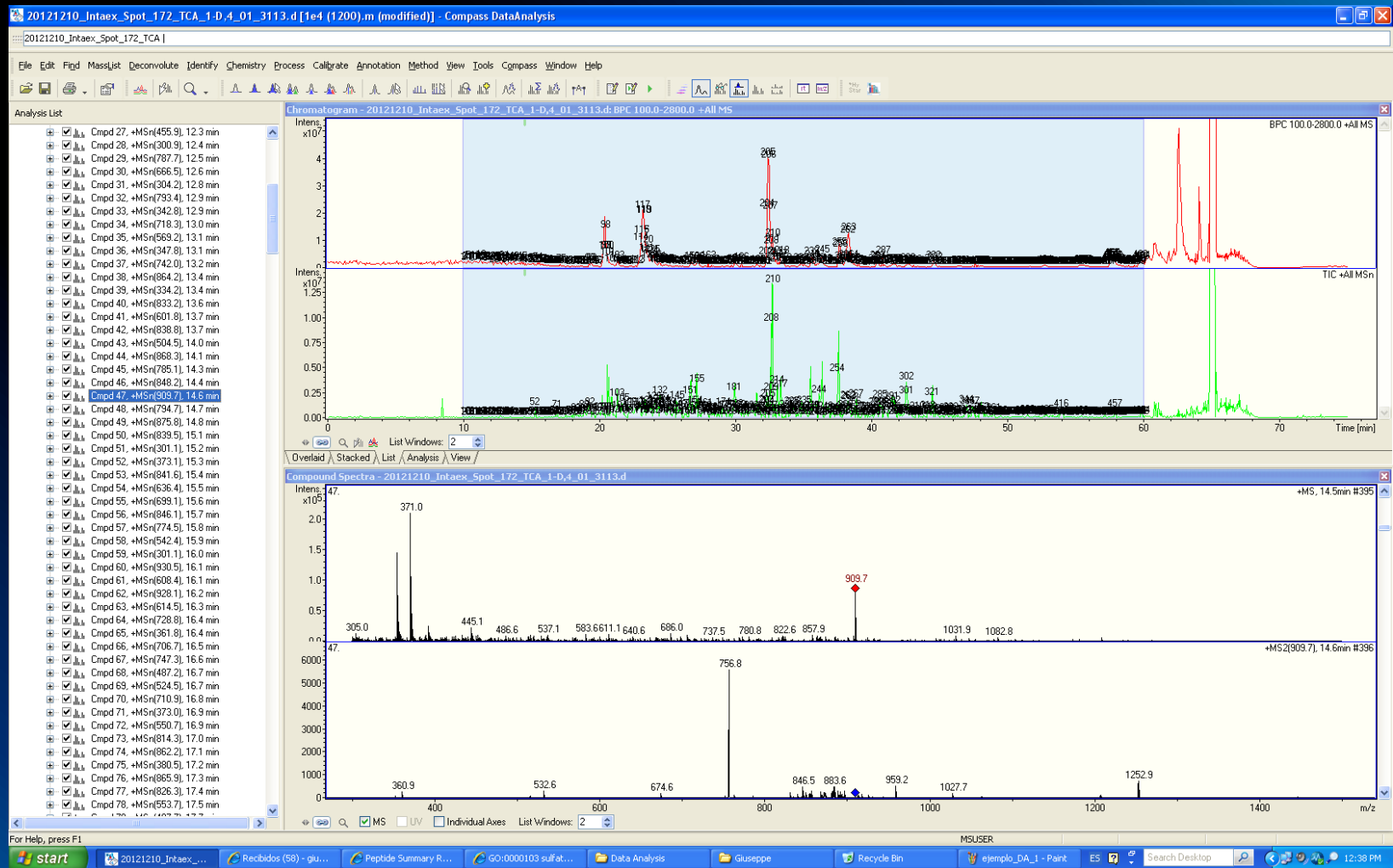


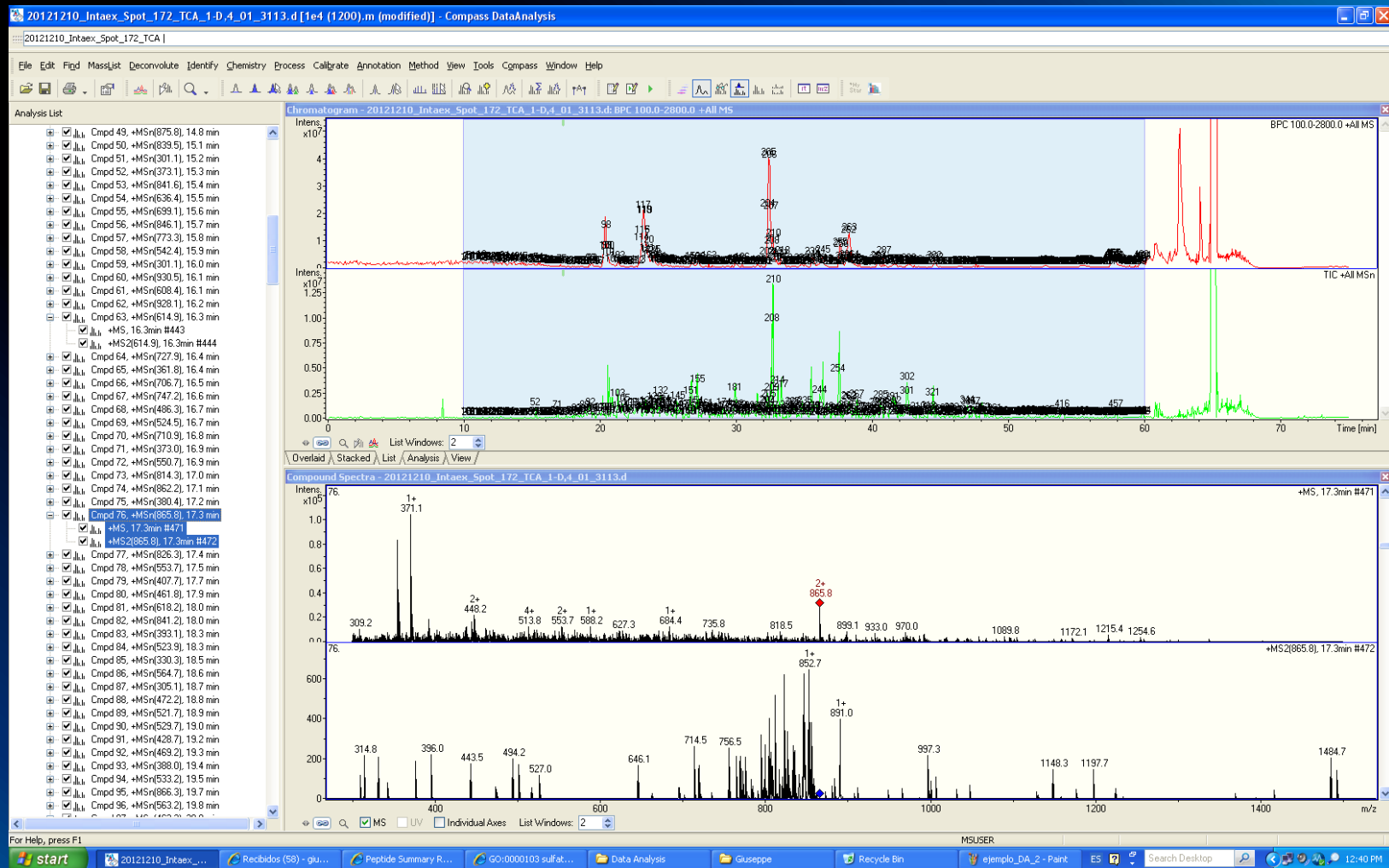
¿Cómo se hace?











Matrix Science - Mascot - MS/MS Ions Search - Windows Internet Explorer

http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=MIS

File Edit View Favorites Tools Help

Matrix Science - Mascot - MS/MS Ions Search

HOME | WHAT'S NEW | MASCOT | HELP | PRODUCTS | SUPPORT | TRAINING | CONTACT

Search Go

Mascot > MS/MS Ions Search

MASCOT MS/MS Ions Search

Your name: Giuseppe Lattanzio Email: giuseppe.lattanzio@eead.csic.es

Search title: 20121210_Intaex_Spot_85_HCL_1-D_5_01_3114

Database(s): Environmental_EST, SwissProt, NCBInr, contaminants, cRAP

Enzyme: Trypsin

Allow up to: 1 missed cleavages

Quantitation: None

Taxonomy: ... Viridiplantae (Green Plants)

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)

Variable modifications: Oxidation (M)

Display all modifications ☐

Peptide tol. \pm 0.2 Da # 13C 0 MS/MS tol. \pm 0.6 Da

Peptide charge: 2+, 3+ and 4+ Monoisotopic ☒ Average ☐

Data file: Z:\LC-MS\2012\12Diciembre\10 Browse...

Data format: Mascot generic Precursor: m/z

Instrument: ESI-TRAP Error tolerant ☐

Decoy ☐ Report top: AUTO hits

Start Search ... Reset Form

Copyright © 2008 Matrix Science Ltd. All Rights Reserved.

Waiting for http://www.matrixscience.com/cgi/nph-mascot.exe?1...

start 20121210_Intaex_Sp... Redactor - giuseppe.L... Matrix Science - Masc... Data Analysis

Internet 100% Search Desktop 12:11 PM

Catálogos de secuencias

<http://www.uniprot.org>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

Recursos informáticos

<http://www.expasy.org/tools/>

<http://www.geneontology.org>

<http://www.matrixscience.com>

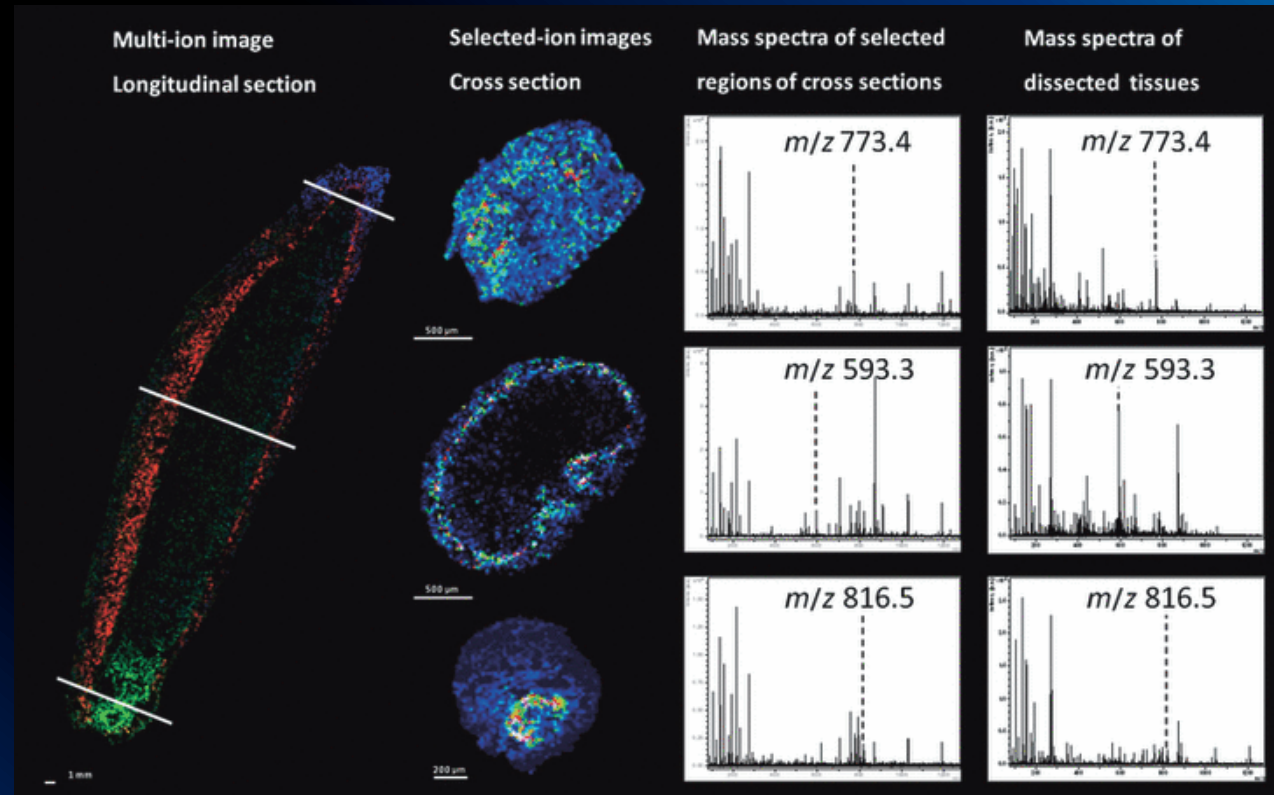
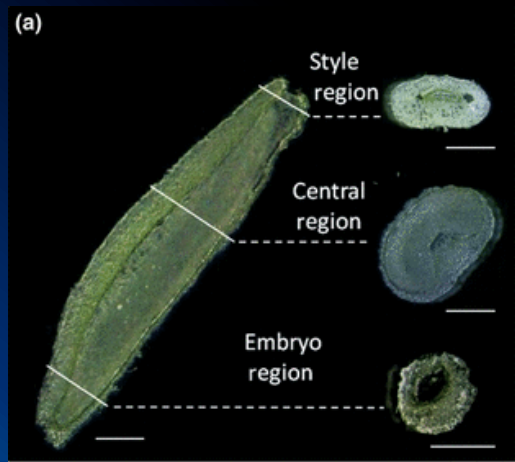


Plant Stress Physiology

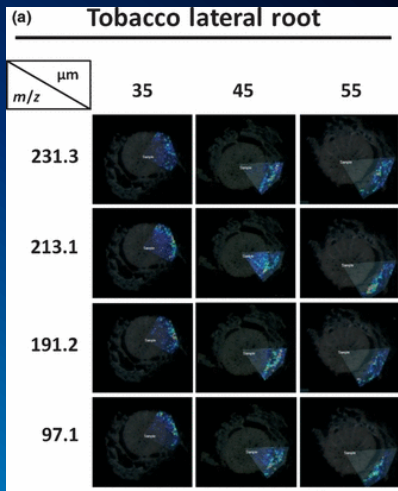
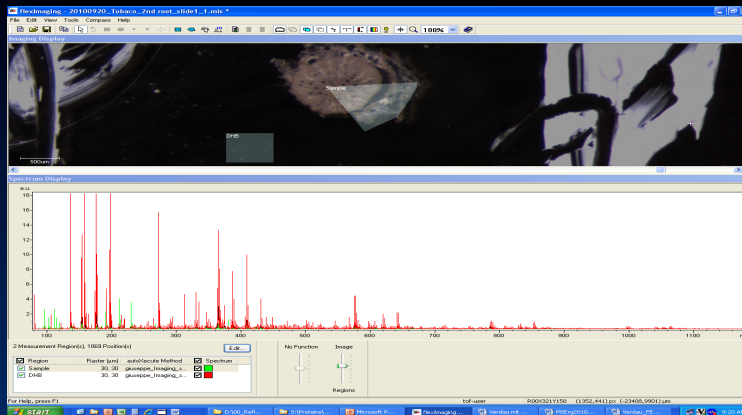
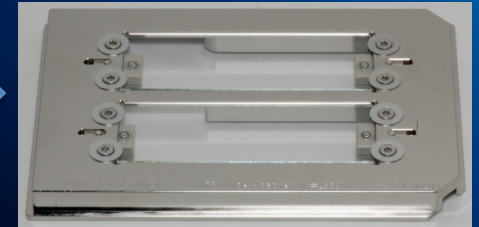
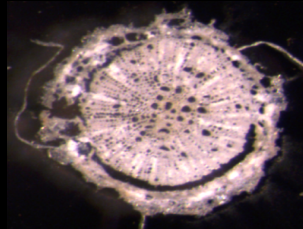
ESTACIÓN
EXPERIMENTAL
DE AULA DEI



Imaging Mass Spectrometry (IMS)



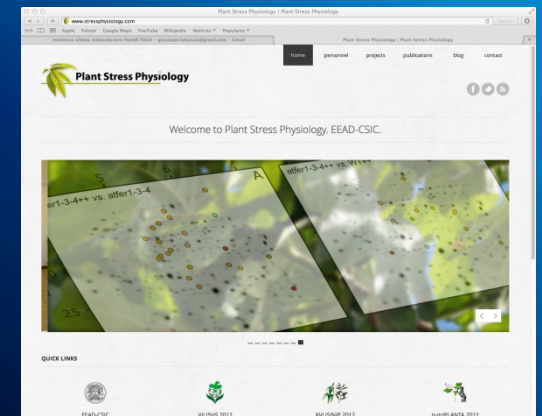
MALDI IMS



Plant Stress Physiology

ESTACIÓN
EXPERIMENTAL
DE AULA DEI





<http://www.stressphysiology.com>

Grazie!!!



Plant Stress Physiology

ESTACIÓN
EXPERIMENTAL
DE AULA DEI

